

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 5 月 3 日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/30993 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C12Q 1/68 (74) 代理人: 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07430
- (22) 国際出願日: 2000 年 10 月 24 日 (24.10.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/302399  
1999 年 10 月 25 日 (25.10.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 湧永製薬株式会社 (WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三谷康正 (MITANI, Yasumasa) [JP/JP]; 〒739-1195 広島県高田郡甲田町下甲1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING TARGET NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 目的核酸の検出法

(57) Abstract: A method of specifically detecting a target nucleic acid in a biological material characterized by comprising: (a) the step of bringing the target nucleic acid or a chain complementary thereto into contact with a first labeled nucleic acid primer complementary to either, or a primer set containing this primer to thereby form a primer extension product; (b) the step of denaturing the first nucleic acid primer extension product as described above to give a denatured chain; (c) the step of bringing this denatured chain into contact with a second labeled nucleic acid primer complementary thereto to form a both-labeled primer extension product; and (d) the step of developing this both-labeled primer extension product on a chromatographic carrier having specifically binding reagents which bind specifically to the labels of the first labeled nucleic acid primer and the second labeled nucleic acid primer; and a kit for detecting a target nucleic acid with the use of this method. Use of the detection method/detection kit makes it possible to conveniently, quickly and highly sensitively detect the presence or absence of the target nucleic acid in a sample.

[続葉有]

WO 01/30993 A1



---

(57) 要約:

本発明は、生物材料中の目的核酸を特異的に検出する方法であって、(a) 目的核酸又はその相補鎖に、それらのいずれかと相補的な第一標識核酸プライマー又は該プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる工程、(b) 該第一核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする工程、(c) 該変性鎖に、これと相補的な第二標識核酸プライマーを接触させて両標識プライマー伸長生成物を形成させる工程、(d) 該両標識プライマー伸長生成物を、第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの標識と特異的に結合する特異結合試薬を有するクロマトグラフィー担体に展開させる工程、を行うことを特徴とする目的核酸の検出法、及び該検出法を用いた目的核酸の検出キットに関する。本発明の検出法／検出キットを用いれば、検査試料中の目的核酸の有無を、簡便、迅速且つ高感度で検出することができる。

## 明 細 書

## 目的核酸の検出法

## 技術分野

本発明は、生物試料中の目的核酸を特異的に検出するための方法及びキットに関する。

## 背景技術

近年、核酸の検出に関する研究や診断技術が急速に進歩し、検査試料中の特定遺伝子を検出する方法として、遺伝子クローニング法、サザンブロッティング法、遺伝子増幅法及びハイブリダイゼーション法等いくつかの方法が知られている。

中でも、PCR法 (polymerase chain reaction method) やRT-PCR法 (reverse transcriptase polymerase chain reaction method) に代表される遺伝子増幅法は、検出感度が高い方法として広く研究及び利用されている。

また、標的核酸と相補的な塩基配列をもつ単鎖又は二本鎖を放射性あるいは非放射性的の標識物質で標識し、標的配列との相補性を利用して標的配列を検出するハイブリダイゼーション法も、目的核酸又は目的核酸増幅物の存在を検出するための方法として広く用いられている。最近ではプローブを担体に固定する液相－固相ハイブリダイゼーション法 (T. R. Gingerasら : Nucleic Acid Res.15、5373-5390等) やサンドイッチ型の液相－液相ハイブリダイゼーション法 (Ann-Christine Syvaenenら : Nucleic Acid Res.14、5037-5048(1986)、特開昭62-229068号公報等) も考案されている。

しかし、PCR法やRT-PCR法においては、目的DNA又はRNAの増幅は短時間で行なえるものの、増幅されたDNA断片の検出操作が煩雑で検出する

までに時間が掛かる等の問題があり、ハイブリダイゼーション法においては操作が煩雑で手間がかかり、また感度等の点でも十分満足のいくものは得られていない。

また最近では、検出感度の向上と操作の簡便性を目的として、PCR法などの遺伝子増幅法とハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法、例えばPCRで増幅した標識DNAと固相に結合されたプローブDNAとで液相－固相間のハイブリダイゼーション反応を行うことによって目的の核酸を検出する方法が報告されている（欧州特許公開192168号公報、同78139号公報）。しかし、当該検出法は、多くは核酸の増幅と検出が別々の系で行われており、その結果、増幅により得られた産物が検出前に周囲の物質と接触することとなり、交差汚染や偽陽性結果を招く危険性があった。また、目的核酸の検出には核酸の分離を必要とし、分析にかなりの時間を要していた。

更に、第一標識核酸プライマーをセンスプライマーとし、第一標識核酸プライマーと異なる標識物で標識された第二標識核酸プライマーをアンチセンスプライマーとしてPCR等の手法を用いて核酸の増幅を行う方法も報告されているが、当該方法では目的とする核酸増幅物以外に非特異的な増幅物が得られた場合に、それが最終的に擬陽性として検出されてしまうという欠点があった。

## 発明の開示

本発明の目的は、簡便な操作方法で、迅速且つ高感度で目的核酸を検出するための方法及びキットを提供することにある。

本発明者らは、斯かる実状に鑑み、操作が複雑なハイブリダイゼーション反応を必要としない核酸の検出法について鋭意検討した結果、二種類の標識物で標識されたプライマー伸長生成物を得た後、アフィニティークロマトグラフィーを利用することにより、簡便・迅速且つ高感度に目的核酸を検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、生物材料中の目的核酸を特異的に検出する方法であって、

(a) 目的核酸又はその相補鎖に、それらのいずれかと相補的な第一標識核酸プライマー又は該プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる工程、

(b) 該第一核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする工程、

(c) 該変性鎖に、これと相補的な第二標識核酸プライマーを接触させて両標識プライマー伸長生成物を形成させる工程、

(d) 両標識プライマー伸長生成物を、第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの標識と特異的に結合する特異結合試薬を有するクロマトグラフィー担体に展開させる工程、

を行うことを特徴とする目的核酸の検出法を提供するものである。

また本発明は、生物材料中の目的核酸を特異的に検出するキットであって、

(a) 目的核酸又はその相補鎖に、それらのいずれかと相補的な第一標識核酸プライマー又は該プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる手段、

(b) 該第一核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする手段、

(c) 該変性鎖に、これと相補的な第二標識核酸プライマーを接触させて両標識プライマー伸長生成物を形成させる手段、

(d) 該両標識プライマー伸長生成物を、第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの標識と特異的に結合する特異結合試薬を有するクロマトグラフィー担体に展開させる手段、

からなる目的核酸の検出キットを提供するものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の目的核酸の検出法は、上記工程 (a) ～ (d) からなるものであるが、より高感度の検出が求められる場合、例えば特に検出対象の塩基配列の量が

少ない時は、公知の核酸増幅反応を伴うことができる。斯かる核酸増幅法としては特に限定されるものではないが、リガーゼ連鎖法（LCR）やPCR法（特開昭62-281号公報）が挙げられ、特にPCR法が好ましい。例えばPCR法を用いる場合は、PCR試薬の存在下、（a）第一標識核酸プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる工程と、（b）該第一標識核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする工程を、例えば20～40サイクル繰り返し行なうことにより標識核酸を増幅することができる。

ここで、プライマーセットとは、センスプライマーと、反対側の目的核酸配列に相補的なプライマー（アンチセンスプライマー）との組み合わせをいい、本発明においてはこれらのうちのいずれか一方又は双方が第一標識されていればよい。

本発明の目的核酸の検出法において用いられる第一標識核酸プライマーと第二標識核酸プライマーは、それぞれ異なる塩基配列を有し、且つ異なる標識をもつことが必要である。

両プライマーの塩基配列が異なるものとする事により、第二標識核酸プライマーが、第一標識核酸プライマーにより伸長された伸長生成物のうち該プライマー配列以外の配列の一部を認識することによってアニーリングが起った場合にのみ両標識物を有する2本鎖状態のプライマー伸長生成物（両標識プライマー伸長生成物）が形成され、目的の核酸が検出されることになる。

斯かる両プライマーを用いれば、それぞれの伸長生成物の融解温度が異なるものとなり、それぞれの至適アニーリング温度でアニーリング及び伸長反応を行うことにより、プライマーダイマー等の両末端が異なる標識物をもつ非特異的な反応副生成物が生成されることを排除できる。尚、第一標識核酸プライマーと第二標識核酸プライマーの配列長に、3～20mer、好ましくは3～15merの差を設けることが、アニーリングの選択性を高める上で好ましい。

標識は、クロマトグラフィー担体上に存在する特異結合試薬と特異的に結合するものである必要がある。特異結合試薬及びそれと特異結合する物質の組み合わせ

せとしては、例えば、ビオチンとストレプトアビジン或いはアビジン、ハプテンと抗体、リガンドとレセプターなどの組み合わせが挙げられる。このうち、一般的にはオリゴヌクレオチドの方に、熱に対して安定性の高く、分子の大きさの小さいものを用いることが好ましい。例えば、ビオチンとストレプトアビジンの場合にはプライマーにビオチン標識を行ない、クロマトグラフィー担体側にストレプトアビジンを塗布させておくことが好ましく、プライマーはビオチンとストレプトアビジンの結合によってクロマトグラフィー担体上に結合する。

また、第一標識核酸プライマーと第二標識核酸プライマーの何れか一方の標識は、クロマトグラフィー担体の所定の位置（検出領域）に固相化された特異結合試薬と結合可能なものである必要があり、斯かる標識としては例えば固相化抗DNP抗体に対するDNPが挙げられる。

これらビオチン、ハプテン、リガンド等の標識物は、いずれも単独、或いは必要があれば複数の組み合わせで公知の手段（特開昭59-93099号、同59-148798号、同59-204200号各公報参照）により導入することができる。

標識核酸プライマーに用いる核酸は、天然の核酸をそのまま使用してもよく、また合成オリゴヌクレオチド配列を利用しても良い。プライマー中の標識物の位置はプライマーの伸長反応の効率に大きく影響を与えないところであればよく、好ましくは5'末端付近の水酸基部分、塩基部分或いはリン酸ジエステル部分の活性基が挙げられる。

第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの好ましい態様としては、第一標識核酸プライマーとしてビオチン等の検出用特異結合物質で標識されたものを、第二標識核酸プライマーとしてDNP等の固相化試薬と結合可能な物質で標識され、その配列長が第一標識核酸プライマーより3～15mer異なるものを選択する場合が挙げられる。

目的核酸と第一標識核酸プライマーを接触させることによるアニーリング及び

伸長反応（工程（a））は、通常のアニーリングに用いられる条件が適用でき、例えば、30～80℃で5秒、好ましくは35～72℃で10～60秒行なわれる。

また、第二標識核酸プライマーを用いるアニーリング及び伸長反応は、第一標識核酸プライマーによってアニーリング及び伸長されたプライマー伸長生成物、更には増幅反応によって増幅された核酸増幅物を鋳型としてそれと相補的な第二標識核酸プライマーにより行われる。斯かる反応は、第一標識核酸プライマーとして第二標識核酸プライマーより長い配列長を有するものを用いた場合には、工程（a）における目的核酸と第一標識核酸プライマー伸長生成物との融解温度より低い温度で行うことが必要である。

かくして、両標識物を有する2本鎖状態のプライマー伸長生成物（両標識プライマー伸長生成物）を得ることができ、その2本鎖核酸を、第一、第二標識核酸プライマーの標識と特異に結合する抗体などの特異結合試薬を有するクロマトグラフィー担体に展開させることにより、簡便・迅速且つ特異的に目的核酸の有無を検知することをことができる。即ち、本発明の目的核酸の検出法においては、クロマトグラフィー担体上で検出される目的核酸は、両標識物を有する2本鎖核酸のみであることから、目的とする核酸増幅物以外に非特異的な増幅物が得られた場合においても、それが検出されることはない。

両標識プライマー伸長生成物の検出は、いわゆるアフィニティークロマト法が用いられる。具体的には、クロマトグラフィー担体の所定の位置（検出領域）に両標識物を有する2本鎖核酸のうちの一方の標識物と結合する抗体等の特異結合試薬を固相化し、更にもう一方の核酸標識物と結合することのできる特異結合試薬をクロマトグラフ媒体のより上流側に湿潤時に移動可能なように乾燥状態で保持しておき、両末端が異なる標識物をもつ目的核酸増幅物を含む試料を上記クロマトグラフィー担体の上流より毛細管現象を利用して展開させるものである。即ち、最初に目的核酸伸長物と特異結合試薬が反応しながら展開し、最終的に検出



領域でサンドイッチ状複合体の形で、目的核酸を捕獲して検出する方法である。

当該アフィニティークロマトグラフィー担体の利用により、ハイブリダイゼーションを行う方法に比べて極めて短い時間、例えば後記実施例で示すように10分以内の短い時間で目的核酸の検出を行なうことができる。

また、その検出方法も簡便であり、特殊な技術や装置を必要とせず、多検体を同時に検査することもできる。しかもその確認は、視覚的に行なうこともでき極めて簡単である。

ここで、用いられるクロマトグラフィー担体は、目的増幅核酸が安定かつ良好にクロマトグラフィー担体上を移動して十分な展開がなされ、検出領域に確実に到達できるような大きさのポアサイズを有することが必要であり、例えば、ガラス繊維濾紙、セルロース膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等が挙げられる。

クロマトグラフィー担体上に固相化される特異的結合試薬は、あらかじめ決められた検出領域に固相化され、この領域で目的核酸標識物と結合する。斯かる検出領域に固相化されている特異結合試薬としては、ハプテンに対する抗体、例えばDNPに対する抗DNP抗体等が挙げられる。尚、斯かる抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであっても構わない。

一方、クロマトグラフィー担体上に移動可能な状態で保持される特異結合試薬としては、粒子状の特異結合試薬であり且つ直接目視可能な物質が好ましい。ここで粒子状特異結合試薬の粒子としては、コロイド粒子、無機粒子、セラミック粒子、金属、またはその酸化物粒子、ゲル状粒子、合成高分子粒子、染料ゾルなどが挙げられるが、粒子の分散安定性の点で特に金コロイドなどの金属コロイド粒子やラテックス粒子などの合成高分子粒子が好ましい。尚、特異結合試薬としては前記したとおりであり、アビジン、ストレプトアビジン等が好ましい。

尚、本発明に用いる生物材料は、目的核酸を含んでいればどのようなものであってもよく、斯かる材料の採取源としては、植物、昆虫および動物が挙げられ、好ましい生物材料としては、血清、血漿、髄液、生検試料、組織培養細胞若しく

は組織培養細胞からの増殖培地、組織抽出物又は膜洗浄液等が挙げられる。

## 実施例

以下に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

### 参考例1 標識核酸プライマーの調製

目的核酸として腸管出血性大腸菌（E. coli）のベロ毒素1型遺伝子（VT1）を選択した。下記の様な第一標識核酸プライマーセットと第二標識核酸プライマーを使用した。

#### （1）第一標識核酸プライマーセット

Biotin-5' TTTACCTTAGACTTCTCGAC 3'（配列番号1）

5' CACATATAAATTATTTTCGTTC 3'（配列番号2）

#### （2）第二標識核酸プライマー

DNP-5' TATTTTCGTTCAACAATAAGCCGTAGATTAT 3'（配列番号3）

第一標識核酸プライマーのセンス側のプライマーは、金コロイド標識ストレプトアビジンに結合可能な標識物として、5'末端にビオチンを導入し、アンチセンス側のプライマーは非標識とした。

第二標識核酸プライマーは、アフィニティークロマトグラフ媒体上の固相化抗DNP抗体に結合可能な標識物として、5'末端にDNPを導入した。

### 参考例2 金コロイド標識ストレプトアビジンを吸収させたパットの調製

金コロイド溶液1mL（BBI社製；粒径40 $\mu$ m）にストレプトアビジン0.1mgを添加し、5分間攪拌した。10%BSA（pH9.0）を0.1mL加え、10分間攪拌し、ブロッキングを行なった後、1%BSA、0.05%PEG20,000を含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.2）で3回遠心洗浄し、沈査を1%BSA、0.05%PEG20,000を含む20mM

トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2) で再浮遊させ、5% BSA、0.05% PEG 20,000、0.3 M NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2) で2倍希釈した。得られた金コロイド標識化ストレプトアビジンを波長 520 nm で吸光度が 1.0 になるように、3% BSA、0.05% PEG 20,000、0.15 M NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2) で希釈した。金コロイド標識ストレプトアビジンをコンジュゲートパットに吸収させ、一晚凍結乾燥させ、金コロイド標識ストレプトアビジンのパット調製を行なった。

### 参考例3 アフィニティークロマトグラフィー担体の調製

クロマトグラフィー担体としてイムノダインABC (Paul社) を選び、抗 DNP マウスモノクローナル抗体を 10 mM リン酸緩衝液生理食塩水で、5 mg/mL に調製し、ディスペンサー装置ショットマスターII (武蔵エンジニアリング社) を用い、1  $\mu$ L / 1 cm となるようにライン状に塗布し、自然乾燥させた後、ゼラチンブロッキング後、洗浄し、陰圧乾燥させた。テープ上に反応膜と前記の金コロイド標識ストレプトアビジンパッドを貼り付け、免疫クロマトグラフィー担体とした。得られた免疫クロマトグラフ媒体はシリカゲルと共にアルミ袋に保存した。

### 実施例1 目的核酸の検出

一夜培養したベロ毒素1型遺伝子 (VT1) を有する腸管出血性大腸菌 (E. coli) を滅菌水で  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$  cells/mL に調製した。それら 100  $\mu$ L を 1.5 mL チューブに分取し、95℃で 10 分間加熱した後、その溶液 10  $\mu$ L を目的核酸試料として核酸増幅に供した。

上記の第一標識核酸プライマーをそれぞれ 50 ng 用いて、40  $\mu$ L の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、各 200  $\mu$ M の dATP、dGTP、dCTP、dTTP、1.25

unitのTaq DNAポリメラーゼを含む溶液および前記の目的核酸試料10 $\mu$ Lをそれぞれ同一のPCR用チューブに入れ、PCR法による増幅反応を行なった。この反応は、94℃で10分間加熱後、94℃、30秒、50℃、30秒、72℃、30秒のサイクルで40回繰り返した。

目的核酸増幅物を以下の方法で検出した。尚、比較として電気泳動法による検出を行なった。

#### 検出法1：

前記のPCR反応チューブ中に、上記の第二標識核酸プライマー（50ng/ $\mu$ L）を1 $\mu$ L添加した。PCR装置を用い、98℃で3分間熱変性、65℃で30秒間アニーリング、72℃で30秒間伸長反応を行なった。各反応液を上記の免疫クロマトグラフィー担体に展開させ、5分後に発色の有無を目視判定した。結果を表1に示す。

#### 検出法2（比較例）：

アガロースゲルを用い、100Vで30分間電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色後、紫外線照射により、目的核酸増幅物のバンドを確認した。結果を表1に併せて示す。

表1

目的核酸の菌数	検出法1	検出法2（比較例）
10 <sup>6</sup> CFU/mL	++	++
10 <sup>5</sup> CFU/mL	+	+
10 <sup>4</sup> CFU/mL	±	±
10 <sup>3</sup> CFU/mL	—	—
0CFU/mL	—	—

++：シグナルの発色が強

＋：シグナルの発色が有

—：シグナルの発色がなし

±：シグナルの発色が不明瞭

表 1 に示すように、本発明の目的核酸の検出法は、電気泳動法と同程度の感度での検出が可能であった。

#### 産業上の利用可能性

本発明による目的核酸の検出法は、いわゆるハイブリダイゼーション反応における煩雑な操作を行なわないでプライマーによる伸長反応を行なうために、分析時間を大幅に短縮することができ、また、簡易なアフィニティークロマトグラフィーを利用することで、簡便・迅速且つ高感度に検体を分析することが可能となる。また、ハイブリダイゼーションや電気泳動の場合に必要な核酸の分離操作を必要としないため、試料は粗精製の状態でよく試料の調製も容易である。

さらに、それぞれの検出しようとする試料中において、目的核酸の塩基配列が微妙に（一塩基以上）異なる場合も、ポリメラーゼ等の反応条件を適切に調節することにより、プライマーが目的核酸に完全に相補的である場合とそうでない場合を区別することができる。つまり、ハイブリダイゼーション法などによらないで容易に点突然変異をも検出することができる。

また、それぞれ異なる標識物質で標識された複数のプライマーを使用すれば、同時に 1 種類以上の目的核酸に対するアニーリング及び伸長反応を行なうことができ、同時に複数の目的核酸を検出することも可能である。

## 請求の範囲

1. 生物材料中の目的核酸を特異的に検出する方法であって、

(a) 目的核酸又はその相補鎖に、それらのいずれかと相補的な第一標識核酸プライマー又は該プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる工程、

(b) 該第一核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする工程、

(c) 該変性鎖に、これと相補的な第二標識核酸プライマーを接触させて両標識プライマー伸長生成物を形成させる工程、

(d) 該両標識プライマー伸長生成物を、第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの標識と特異的に結合する特異結合試薬を有するクロマトグラフィ担体に展開させる工程、

を行うことを特徴とする目的核酸の検出法。

2. 工程(a)と工程(b)を繰り返す行うものである請求項1記載の目的核酸の検出法。

3. 生物材料中の目的核酸を特異的に検出するキットであって、

(a) 目的核酸又はその相補鎖に、それらのいずれかと相補的な第一標識核酸プライマー又は該プライマーを含むプライマーセットを接触させてプライマー伸長生成物を形成させる手段、

(b) 該第一核酸プライマー伸長生成物を変性させて変性鎖とする手段、

(c) 該変性鎖に、これと相補的な第二標識核酸プライマーを接触させて両標識プライマー伸長生成物を形成させる手段、

(d) 該両標識プライマー伸長生成物を、第一標識核酸プライマー及び第二標識核酸プライマーの標識と特異的に結合する特異結合試薬を有するクロマトグラフィ担体に展開させる手段、

からなる目的核酸の検出キット。

## SEQUENCE LISTING

<110> WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Method for detecting objective nucleic acid

<130> WP0029

<150> JP P1999-302399

<151> 1999-10-25

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>1

tttaccttag acttctcgac 20

<210>2

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>2

cacatataaa ttatttcggt c 21

<210>3

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>3

tatttcgttc aacaataagc cgtagattat 30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-176800, A (Bio Sensor Kenkyusho K.K.), 20 July, 1993 (20.07.93), (Family: none)	1-3
A	EP, 439222, A (CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS INC), 31 July, 1991 (31.07.91) & JP, 7-46999, A & CA, 2031659, A & FI, 9100396, A & US, 5328825, A & DE, 69114023, E	1-3
A	JP, 7-75599, A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 20 March, 1995 (20.03.95), (Family: none)	1-3
A	WO, 94/26934, A2 (BAXTER DIAGNOSTICS INC), 24 November, 1994 (24.11.94) & JP, 7-508891, A & AU, 9469456, A & EP, 655091, A1	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 January, 2001 (12.01.01)

Date of mailing of the international search report  
23 January, 2001 (23.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/07430

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 5-176800, A (株式会社バイオセンサー研究所) 20.7月.1993 (20.07.93) パテントファミリーなし	1-3
A	EP, 439222, A (CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 31.7月.1991 (31.07.91) & JP, 7-46999, A & CA, 2031659, A & FI, 9100396, A & US, 5328825, A & DE, 69114023, E	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.01.01

国際調査報告の発送日

23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-75599, A (日本合成ゴム株式会社) 20. 3月. 1995 (20. 03. 95) パテントファミリーなし	1 - 3
A	WO, 94/26934, A2 (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 24. 11月. 1994 (24. 11. 94) &JP, 7-508891, A & AU, 9469456, A & EP, 655091, A1	1 - 3